

FACULTÉ DE MÉDECINE SAINT-ANTOINE PARIS

ANNÉE 1971

N°

101

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

Diplôme d'État

par

JACQUELINE BRIFFOD

Née le 26 Mars 1943 à BONNEVILLE (Haute-Savoie)

Présentée et soutenue publiquement le :

SPÉCIFICITÉ DE L'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION
APPLIQUÉE AU DIAGNOSTIC DE LA RUBÉOLE

Président : Monsieur G. DAGUET - Professeur

FACULTE de MEDECINE SAINT-ANTOINE PARIS

oooooooooooooooooooooooooooo

ANNEE 1971

N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

par Jacqueline BRIFFOD

née le 26 mars 1943 à Bonneville (Haute-Savoie)

Présentée et soutenue publiquement le :

SPECIFICITE DE L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION
APPLIQUEE AU DIAGNOSTIC DE LA RUBEOLE

Président : M. G. DAGUET, Professeur



UNIVERSITE PARIS VI
FACULTE DE MEDECINE SAINT-ANTOINE

Professeurs titulaires

M.M. ANDRE R.	Hématologie	M.M. HUGELIN A.	Physiologie
BRISAUD H	Pédiatrie	LAPLANE R.	Pédiatrie
BROCARD R.	Médecine	LELORIER G.	Obstétrique
CAROLI J.	Médecine	LOEPER J.	Médecine expérimentale
CATINAT J.	Cardiologie	LOYGUE J.	Immunologie
CERBONNET G.	Chirurgie	LOYGUE J.	Chirurgie
CHERIGIE Ed.	Radiologie	MAROIS M.	Histologie
CHIGOT P.L.	Chirurgie infantile	MERGER R.	Obstétrique
CONTAMIN Fr.	Neurologie	MILHAUD G.	Biophysique
CONTE M.	Médecine	NICK J.	Neurologie
DAGUET L.	Bactériologie	ORCEL L.	Anatomie pathologique
DEBRAY J.	Médecine	PERRAULT M.	Médecine
FLABEAU F.	Chirurgie	POLONOVSKI Cl.	Pédiatrie
GERBEAUX J.	Thérapeutique	POLONOVSKI J.	Biochimie
GOSSET J.	Chirurgie	RICHEL G.	Néphrologie
		WOLFROMM R.	Médecine

Professeurs sans chaire

M.M. BRICOUT F.	Bactério-Virologie	M.M. GOLVAN Y.J.	Parasitologie
CHALUT J.	Radiologie	LESTRADET H.	Pédiatrie
Mme CHAPUT A.	Stomatologie	PICARD J.	Biochimie
M.M. DUHAMEL G.	Hématologie	ROUX Ch.	Embryologie
GIRARD F.	Physiologie		

Maîtres de Conférences

M.M. AKOUN G.	Médecine	M.M.	LASFARGUES G. Pédiatrie
ARDAILLOU R.	Physiologie		LAUGIER A. Radiologie
BAUX S.	Chirurgie		LEVY V.G. Médecine
BOURY G.	Chirurgie		MALAFOSSE M. Chirurgie
CHEYMOL G.	Pharmacologie		MENSCH B. Biophysique
CHOUARD Cl.	O.R.L.		MERY J. Ph. Néphrologie
CLOAREC M.	Médecine	Mme	MIGNON Fr. Néphrologie
Mme COMBRISSE A.	Hématologie	M.M.	OPOLON J. Médecine
M.M. COSCAS G.	Ophthalmologie		PAQUELIN Fr. O.R.L.
DAUTRY P.	Chirurgie		PIERON R. Médecine
DELIGNE P.	Anesthésiologie		PISSARRO B. Médecine préventive
DOYON D.	Radiologie		POULET J. Médecine
DRY J.	Médecine		RAMPINI Cl. Biochimie
FOUET P.	Thérapeutique		RICHARDET J.M. Pédiatrie
GAUTIER H.	Physiologie		ROLAND J. Anatomie pathologique
GRUNER M.	Chirurgie infantile		SALAT J. Obstétrique
GUILMET Cl.	Anesthésiologie		SALMON Ch. Hématologie
GUIRAUDON G.	Anatomie		SANTARELLI J. Obstétrique
HERMAN D.	Médecine		WARGON H. Médecine expérimentale
HUGUET Cl.	Chirurgie		WEINMANN S. Biochimie
HUGUIER M.	Chirurgie		

Enseignants Associés

Professeur Associé	MM.	BLOCH-MICHEL H.	Rhumatologie
M. C. A. Associé		ELIAKIS Em.	Médecine légale

Enseignant Contractuel

M. C. A.	M.	KIRSCH F.	Physiologie biochimique
----------	----	-----------	-------------------------

Chargés d'Enseignement

MM.	BENOIST	Rhumatologie	M.M.	DUNET	Endocrinologie
	BRUEZIERE	Chirurgie infantile		LOFFREDO	Obstétrique
	CRISTOL	Cardiologie		SALOMON	Rhumatologie

Attachés d'Enseignement

MM.	CASASSUS	Cardiologie	M.M.	HIVET	Chirurgie
	COUVREUR	Thérapeutique		MIGNOT	Neurologie
	DES LAURIERS	Neurologie		SAUVAN	Cardiologie
	GALLOUEDEC	Pneumologie		VANNIER	Pneumologie

A mes Parents

A Monsieur le Docteur Gaston DAGUET

*Professeur de Bactériologie - Virologie à la Faculté de Médecine Saint-Antoine
à PARIS.*

Biologiste des Hopitaux

qui nous fait l'honneur de présider cette thèse.

A Monsieur le Docteur Jacques MAURIN

Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur.

Dans le laboratoire duquel ce travail a été réalisé.

A Monsieur le Directeur de l'Institut Pasteur.

A mes Maîtres dans les Hôpitaux.

J'adresse mes remerciements :

à Monsieur le Docteur Jacques MAURIN qui m'a reçue dans son laboratoire, a inspiré ce travail et l'a guidé tout au long de sa réalisation.

à Monsieur Jean-Louis DELSAL, Docteur ès Sciences, Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, pour les précieux conseils qu'il m'a donnés.

à Monsieur le Professeur Agrégé Jacques PILLOT pour l'assistance technique qu'il m'a procurée.

à Monsieur Claude HANNOUN, Docteur ès Sciences, Chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, pour les avis précieux qu'il m'a apportés.

à Mademoiselle Josiane BEZANCON, technicienne supérieure à l'Institut Pasteur.

à Monsieur Pierre VIALAT, Mesdemoiselles Nathalie GOUSSEFF et Maryse TARDY-PANIT, techniciens à l'Institut Pasteur.

à Madame Janine LAVOLE, aide de Laboratoire à l'Institut Pasteur.

INTRODUCTION

A la suite des observations de l'ophtalmologiste australien CREGG (1942), l'attention du corps médical a été attirée sur l'importance que la rubéole pouvait revêtir dans l'étiologie des malformations congénitales de l'enfant. En France, cette notion a été longue à s'établir, mais a fini par s'imposer.

Cependant, jusqu'à une date récente, l'épidémiologie de l'affection restait mal connue. On ignorait en particulier quel pourcentage de la population présentait une protection acquise ; on ignorait également l'importance des formes inapparentes que rien ne venait révéler aux cliniciens.

En 1962, l'isolement du virus a été réussi aux Etats Unis par PARKMAN, BUESCHER et ARTENSTEIN d'une part et WELLER et NEVA d'autre part, à la suite de quoi d'importants progrès ont été faits dans le domaine de la connaissance de l'épidémiologie de la rubéole.

Cependant, ce n'est qu'en 1966 que la découverte par PARKMAN et collaborateurs du phénomène de l'héماغglutination spécifique a fourni enfin aux chercheurs le moyen d'étude commode et précis nécessaire pour la connaissance complète de l'extension de cette affection et de ses conséquences pratiques pour la Santé Publique.

Actuellement donc, la réaction d'inhibition de l'héماغglutination représente la méthode la plus pratique pour l'étude de la sérologie de la rubéole.

En effet, le virus de la rubéole possède la propriété d'agglutiner les érythrocytes de plusieurs espèces d'oiseaux (poussins, oies, pigeons). Cette héماغglutination peut être spécifiquement inhibée par le sérum des individus ayant eu la rubéole.

Cette réaction peut être utilisée pour la recherche systématique de la présence d'anticorps en dehors de tout contact, ou encore pour établir le diagnostic sérologique chez un malade présentant une éruption, ou chez un sujet ayant été en contact.

Etant donné qu'il existe de nombreuses formes inapparentes ou du moins très frustes, et connaissant le risque foetal ; il est important de s'entourer de garanties suffisantes de spécificité de la réaction.

Il est nécessaire en premier lieu d'éliminer les inhibiteurs non spécifiques fréquemment présents dans le sérum des individus. Pour ce faire, l'Institut Pasteur préconise le traitement des sérums par le kaolin, méthode d'ailleurs classique en virologie (entérovirus, arbovirus surtout).

De plus l'utilisation, parallèlement à l'antigène rubéoleux, d'un antigène du même type héماغglutinant contre lequel la population française ne possède pas d'anticorps, permet d'attester la spécificité de la réaction, facteur important de sécurité.

Comme nous le verrons plus loin, l'antigène utilisé est l'antigène Sindbis.

.../

Le sérodiagnostic de la rubéole est effectué depuis 1967 à l'Institut Pasteur dans le laboratoire du Docteur Maurin.

De très nombreux sérums ont ainsi été examinés. Malgré toutes les précautions observées, 105 de ces sérums se sont montrés porteurs d'inhibiteurs non spécifiques décelés par l'antigène Sindbis après un traitement soigneux par le Kaolin.

Ces inhibiteurs étaient actifs sur cet antigène à des titres de I/10 à I/40 au moins.

La présence de tels inhibiteurs même dans de rares cas pose un grave problème d'interprétation lorsque le titre en anticorps rubéoleux spécifiques est lui même faible. C'est pourquoi il nous apparut intéressant d'une part d'étudier la nature de ces inhibiteurs et d'autre part de tenter de trouver une méthode pratique pour les éliminer.

Nous allons donc successivement, après une description de la technique utilisée à l'Institut Pasteur pour la sérologie de la rubéole, décrire les différents procédés que nous avons utilisés pour traiter les sérums :

- emploi de l'héparine
- sulfate de dextrane
- éther-alcool

Nous comparerons et discuterons ensuite les résultats obtenus puis nous exposerons l'étude que nous avons faite pour tenter de déterminer la nature des substances inhibitrices.

CHAPITRE I

REACTION UTILISEE A L'INSTITUT PASTEUR TECHNIQUE

RESULTATS OBTENUS :

PRINCIPE :

I/ Le virus de la rubéole possède la propriété d'hémagglutiner les globules rouges d'oiseaux; cette propriété a été mise en évidence par PARKMAN et COLL., en 1966.

L'agglutination se produit dans des conditions particulières de température (+ 4° C) et de pH (pH' Compris entre 6 et 6,6). Cependant, l'hémagglutinine n'est pas stable à pH acide ; on ne peut la conserver qu'en milieu alcalin. Ceci nécessite l'emploi de deux tampons pour la réaction : l'un à pH 9 pour préparer les sérums et diluer l'hémagglutinine, et l'autre à pH acide pour préparer la suspension d'érythrocytes. La valeur de ce tampon est déterminée pour que le mélange final soit au pH optimal pour la réaction (6 , 2).

II/ L'hémagglutination est inhibée par le sérum des individus ayant eu la rubéole. En outre, comme nous l'avons vu plus haut, il existe fréquemment dans les sérums humains des substances inhibitrices différentes des anticorps spécifiques.

Afin de les éliminer nous utilisons le traitement par le kaolin. Cette opération sera suivie de l'absorption des sérums par un excès d'érythrocytes. Ceci est destiné à éliminer une éventuelle agglutination non spécifique par des hémagglutinines irrégulières que l'on peut trouver dans le sérum de certains sujets.

III/ Dans le but de vérifier la spécificité de la réaction, nous utilisons parallèlement à l'antigène rubéoleux, et selon la méthode préconisée par Monsieur C. HANNOUN (laboratoire des ARBO-VIRUS IP) un antigène hémagglutinant de même type : l'antigène Sindbis contre lequel la population française ne possède pas d'anticorps.

L'absence d'inhibition de l'hémagglutination de cet antigène garantit la spécificité de la réaction.

MATERIEL et METHODE :

I/ Matériel :

a) On utilise les plaques du modèle conseillé par l'O.M.S. pour les réactions d'inhibition d'hémagglutination : il s'agit de plaques en matière plastique transparente comportant 10 rangées de 8 cupules à fond hémisphérique, d'un volume de 1 ml.

b) Les dilutions et les répartitions sont faites au rhéomètre de Vernes.

.../

2/ Réactifs :

a) Antigène rubéoleux

Le virus de la rubéole est cultivé sur des cellules en lignée continue de rein de hamster, souche BHK 21 C 13.

Cette lignée isolée par STOKER et MACPHERSON en 1962 permet d'obtenir de très bons titres de virus rubéoleux qui se multiplie pourtant sans effet cytopathogène ou presque. Le virus ainsi produit est titré sur cellules de lignée SIRC sur lesquelles il se développe en donnant un effet cytopathogène (LEERHOFF) ce qui facilite le calcul du titre.

Les cellules BHK 21 sont mises en culture en flacons tournants à 37° C dans du milieu de EAGLE (dit BME) additionné de 10 % de sérum de veau.

Lorsque la culture forme un tapis cellulaire continu, le milieu est remplacé par du milieu de EAGLE sans sérum. Les flacons sont inoculés avec 20 ml de virus (titre 10⁶ DCP 50 % par ml) et incubés à 35° C.

Le surnageant est recueilli après 5 jours. Il est inactivé par le formol et si nécessaire traité par le toluène-éther selon la technique de NORRBY de manière à augmenter le titre antigénique. Après quoi, le produit est réparti en flacons de 1 ml, lyophilisé et conservé à + 4° C.

Au moment de l'emploi, chaque flacon est réhydraté avec 1 ml de tampon alcalin.

b) Antigène Sindbis :

Le virus Sindbis est également cultivé sur cellules BHK 21, et l'antigène est obtenu par une technique analogue à celle utilisée pour l'antigène rubéoleux.

* DCP 50 = Dose cytopathogène 50 %

c) Tampon alcalin :

Il répond à la formule suivante correspondant à un pH 9 :

Na Cl	7.02 g
BO ₃ H ₂	3.09 g
NaOH - N	34,24 ml
Fraction V d'albumine bovine	4 g
H ₂ O	Q S p 1000 ml

d) Tampon acide :

NaCl	8,7 g
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	15,75 g
NaH ₂ PO ₄ anhydre	24,34 g
H ₂ O	Q S p 1000 ml

.../

Son pH est calculé de manière qu'après mélange à parties égales avec le tampon alcalin, le résultat soit 6,2.

e) Suspension de kaolin :

kaolin lavé aux acides 250 g
tampon alcalin sans albumine 1000 ml

f) Suspension d'érythrocytes :

Le sang de poussin est prélevé sur liquide d'Alselver.

Les globules sont lavés dans du tampon glucose - gélatine - barbital (GGB). On réalise une suspension à 50 % dans le même tampon. Puis à partir de cette suspension mère on prépare extemporanément une suspension globulaire à 0,30 %.

g) Tampon GGB :

barbital 0,58 g
gélatine 0,60 g
barbital sodique 0,38 g ;
CaCl₂ anhydre 0,02 g
MgSO₄ ; 7 H₂O 0,12 g
NaCl 8,50 g
Glucose 10 g
H₂O QS p 1000 ml

3/ Exécution de la réaction

a) Traitement des sérums

à 0,2 ml de sérum (non inactivé) on ajoute :

0,8 ml de tampon alcalin

1 ml de kaolin

- agitation pendant 20 mn à la température ordinaire sur agitateur de Kahn.

- centrifugation à 2000 tr/mn

- sans décanter on ajoute 0,2 ml de suspension d'érythrocytes de poussin (+ 4° C pendant 1 heure).

- nouvelle centrifugation.

- décantation du surnageant qui est ainsi dilué au 1/10 .

.../

b) Titration des antigènes

- distribution de 0,3 ml de tampon alcalin dans la première cupule d'une rangée de 8 et 0,2 ml dans toutes les autres cupules de cette même rangée.

- on met 0,2 ml d'antigène rubéoleux dans la première cupule, on mélange et on procède à la dilution.

- on procède de même pour l'antigène témoin.

- on ajoute dans toutes les cupules 0,2 ml de tampon alcalin.

- enfin chaque cupule reçoit 0,4 ml de globules à 0,30 %

- incubation une heure à 4° C.

La dernière dilution qui donne une hémagglutination complète est considérée comme l'unité hémagglutinante.

c) Inhibition proprement dite

On opère à froid.

On fait pour chaque sérum des dilutions de 2 en 2 à partir de la dilution au I/10.

- Dans une première rangée, on distingue 0,2 ml de tampon alcalin dans toutes les cupules sauf dans la deuxième. Puis 0,2 ml de sérum dans les trois premières. La première cupule servira de témoin sérum. On dilue à partir de la troisième cupule. On obtient ainsi des dilutions de I/10 à I/640.

Cette rangée recevra l'antigène spécifique.

Dans quelques cas, nous avons dilué les sérums jusqu'à I/5120.

- Dans une deuxième rangée, on distribue 0,2 ml de tampon alcalin dans les troisièmes et quatrièmes cupules ; 0,2 ml de sérum dans la deuxième et la troisième et on fait des dilutions de I/10 à I/40 à partir de cette dernière cupule.

Cette rangée recevra l'antigène de contrôle.

Dans de nombreux cas, nous avons dilué les sérums jusqu'à I/1280 ou plus.

- distribution des antigènes

- On distribue dans toutes les cupules de la première rangée sauf dans la première (témoin sérum) 0,2 ml d'antigène rubéoleux dilué de manière à obtenir 4 unités hémagglutinantes par 0,2 ml.

- Toutes les cupules de la deuxième rangée reçoivent 0,2 ml d'antigène Sindbis dilué.

- De plus, on prépare des témoins des deux antigènes :

.../

On met 0,2 ml de tampon alcalin dans cinq cupules. La première et la deuxième reçoivent 0,2 ml d'antigène rubéoleux dilué.

On dilue à partir de la deuxième et on rétablit les volumes avec du tampon alcalin.

On a ainsi 4 unités hémagglutinantes dans la première cupule, 2 dans la deuxième, 1 dans la troisième et moins de 1 dans les suivantes.

On procède de même pour l'antigène de contrôle.

- Enfin une cupule reçoit 0,4 ml de tampon alcalin. Elle représente le témoin globules.

- Après une incubation de 30 mn à la température du laboratoire, on distribue partout 0,4 ml de suspension d'érythrocytes de poussin à 0,3 %

La plaque est placée à + 4° C pendant une heure puis laissée à la température ordinaire jusqu'à complète sédimentation du témoin globules.

Le titre du sérum est donné par la plus haute dilution présentant une sédimentation complète.

IL NE DOIT Y AVOIR AUCUNE SEDIMENTATION DANS LA RANGEE AYANT RECU L'ANTI-GENE DE CONTROLE.

TIRAGE DES ANTIGENES

N° des cupules	I	2	3	4	5	6	7	8
<u>1ère Rangée</u>								
Tampon alcalin	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigène rubéoleux	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 à rejeter
	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon alcalin	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Erythrocytes	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
<u>2ème Rangée</u>								
Tampon alcalin	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigène Sindbis	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 à rejeter
	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon alcalin	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Erythrocytes	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
<u>3ème Rangée</u>								
Tampon alcalin	0,4							
Erythrocytes	0,4							
Dilutions obtenues	I/4	I/8	I/16	I/32	I/64	I/128	I/256	I/512

INHIBITION PROPREMENT DITE

<u>1ère Rangée</u>								
Tampon alcalin	0,2		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
S Sérum dilué à I/10	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 à rejeter
			0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigène rubéoleux (4u)		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<u>2ème Rangée</u>								
Tampon alcalin			0,2	0,2				
sérum dilué à I/10		0,2	0,2	0,2	0,2 à rejeter			
			0,2	0,2				
Antigène Sindbis (4u)		0,2	0,2	0,2				
<u>3ème Rangée</u>								
Tampon alcalin	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2			0,4
Antigène rubéoleux	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 à rejeter		
		0,2	0,2	0,2	0,2			
Tampon alcalin		0,2	0,2	0,2	0,2			
<u>4ème Rangée</u>								
Tampon alcalin	0,2	0,2	0,2	0,2				
Antigène Sindbis	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2 à rejeter		
		0,2	0,2	0,2	0,2			
Tampon alcalin		0,2	0,2	0,2	0,2			
Erythrocytes	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Dilutions obtenues	T.S	I/10	I/20	I/40	I/80	I/160	I/320	I/640

RESULTATS :

A l'Institut Pasteur, entre 1967 et 1971, le diagnostic sérologique de la rubéole a été effectué sur de très nombreux sérums.

Dans 105 cas, il y avait persistance de l'inhibition de l'hémagglutination de l'antigène Sindbis après traitement de ces sérums par le kaolin. Diverses sortes de kaolin avaient été essayées, et, chaque sérum traité plusieurs fois.

Dans certains cas, le même échantillon a été traité successivement deux fois.

Dans le cadre de ce travail, 58 sérums choisis parmi les 105 cités plus haut ont été à nouveau examinés.

16 ne présentaient plus ce phénomène (ce qui peut peut-être s'expliquer par l'emploi d'un nouveau kaolin).

Il restait donc 42 sérums posant un problème. Ces sérums inhibent l'hémagglutination de l'antigène Sindbis à des titres allant de 1/10 à 1/40 ou plus.

Nous avons d'autre part essayé de connaître l'importance des inhibiteurs non spécifiques.

Pour cela, 55 sérums réagissant bien au traitement par le kaolin et 10 sérums inhibant encore l'hémagglutination de l'antigène de contrôle après action du kaolin ont été titrés non traités : dans ce cas, chaque sérum est dilué au 1/10 et mis en contact avec un excès d'érythrocytes de poussin à 50 % pendant 1 h à 4° C dans le but d'éliminer une éventuelle hémagglutinine non spécifique.

Ils sont ensuite centrifugés ; le surnageant de chaque sérum est décanté et titré. (On utilise l'antigène spécifique et l'antigène de contrôle).

Résultats (voir tableaux I et II)

1/ Etude de 30 sérums présentant aucun anticorps spécifiques après traitement.

- Dans un cas (sérum n° II55), avant traitement, l'antigène Sindbis est agglutiné alors que l'antigène spécifique révèle une inhibition de l'hémagglutination.

- Dans cinq cas (n°s 4368 - 4673 - 3903 - 3371 - 3351) on trouve les mêmes titres avec les deux antigènes.

- Dans tous les autres cas, les titres obtenus avec le Sindbis sont beaucoup plus élevés que ceux obtenus avec l'antigène rubéoleux.

2/ Examen de 25 autres sérums (ils présentent des anticorps spécifiques après action du kaolin).

- 8 sérums (N°s 4400 - 4708 - 4456 - 4328 - 5095 - 4594 - 5180) présentent des titres plus élevés avec l'antigène de la rubéole qu'avec l'antigène Sindbis.

- dans 3 cas, les titres sont les mêmes avec les deux antigènes (n°s 5099 - 4398 - 5283).

- tous les autres sérums de cette série ont des titres plus élevés avec l'antigène de contrôle.

.../

3/ Etude de 10 sérums choisis parmi les 105 sérums cités plus haut.

dans tous les cas, sauf I (n° 365I) l'inhibition de l'hémagglutination de l'antigène Sindbis est plus importante que celle de la rubéole.

D'après ces résultats, on peut penser que l'hémagglutination de l'antigène Sindbis est beaucoup plus sensible à l'action des inhibiteurs non spécifiques que celle de l'antigène rubéoleux.

Ce fait nous paraît important pour la sécurité de la réaction et pour la fiabilité des résultats.

- TABLEAU I -

INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION DE L'ANTIGNE RUBEOLUX ET DE L'ANTIGENE
SINDBIS. TITRES OBTENUS AVANT ET APRES TRAITEMENT DES SERUMS PAR LE KAOLIN.

A) Sérums réagissant normalement au traitement

N° des sérums	TITRES AVANT TRAITEMENT		TITRES APRES TRAITEMENT	
	rubéole	Sindbis	rubéole	Sindbis
5100	160	1280	0	0
4454	60	5120	0	0
5158	80	480	0	0
4368	320	320	0	0
4225	60	1920	0	0
5265	640	5120	0	0
4412	160	2560	0	0
4673	480	640	0	0
4941	80	640	0	0
4559	60	640	0	0
4890	30	1280	0	0
1174	320	1920	0	0
3903	20	20	0	0
3842	20	40	0	0
5510	5120	240	0	0
3697	320	1280	0	0
3472	10	160	0	0
3460	120	1280	0	0
3939	60	5120	0	0
3442	60	120	0	0
3936	20	160	0	0
3497	20	320	0	0
1155	40	0	0	0
4410	120	1280	0	0
5225	60	640	0	0
3371	120	120	0	0
3852	240	1280	0	0
3352	40	1280	0	0
3471	160	240	0	0
3351	240	240	0	0

.../

TABLEAU I (suite)

N° des sérums	TITRES AVANT TRAITEMENT		TITRES APRES TRAITEMENT	
	Rubéole	Sindbis	Rubéole	Sindbis
5234	640	640	640	0
4400	120	10	120	0
4708	160	15	160	0
4456	480	10	160	0
4328	60	10	10	0
5095	640	80	160	0
4594	1280	80	320	0
5099	10	10	10	0
4941	60	640	10	0
4667	120	1280	240	0
4535	640	5120	320	0
4657	2560	5120	160	0
4938	80	80	20	0
4327	640	640	120	0
4599	320	640	20	0
5229	320	640	160	0
5349	1280	5120	320	0
5180	640	160	480	0
5283	80	80	20	0
5348	160	1280	40	0
5344	640	640	320	0
4990	320	640	320	0
4475	640	2560	160	0
5375	80	640	20	0
5823	10	80	20	0

- TABLEAU II -

INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION DE L'ANTIGENE RUBEOLEUX ET DE L'ANTIGENE SINDBIS. TITRES OBTENUS AVANT ET APRES TRAITEMENT PAR LE KAOLIN

b) Sérums présentant encore des inhibiteurs non spécifiques après traitement par le kaolin

N° des sérums	TITRE AVANT TRAITEMENT		TITRE APRES TRAITEMENT	
	rubéole	Sindbis	rubéole	Sindbis
1328	640	640	320	40
119	80	640	60	40
1035	160	640	60	10
7001	40	640	10	10
3651	320	40	80	10
5852	320	640	320	40
1303	160	640	160	40
664	80	640	20	20
7128	80	320	80	20
1281	640	640	640	40

TRAITEMENT DES SERUMS PAR L'HEPARINE EN PRESENCE DE CHLORURE DE MANGANESE

La première technique que nous avons étudiée pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques de ces 40 sérums a été celle décrite par COOPER et COLL.

Elle utilise l'héparine en présence de chlorure de manganèse

- à - 0,1 ml de sérum ces auteurs ajoutent :
- 0,3 ml d'une solution d'héparine - $MnCl_2$

Cette solution est composée :

- d'une part d'héparinate de sodium (5000 U / ml)
- d'une part de chlorure de manganèse
- et de quatre parts de GGB (désigné par ces auteurs DGV, ^{dextrose-}gélatine-véronal)

Un précipité blanc apparaît immédiatement.

Agitation puis incubation à + 4° C pendant 20 mn

Centrifugation pendant 20 mn à 2000 tr / mn

Les dilutions des sérums et la suspension de globules rouges de poussin sont faites avec du GGB. Le titrage est effectué selon la technique de STEWART.

Quelques modifications ont dû être apportées à cette méthode pour les raisons suivantes :

. Nous désirions là encore utiliser l'antigène de contrôle comme garantie de la spécificité de la réaction. Or, l'hémagglutination de l'antigène Sindbis n'est possible que dans une zone de pH très étroite (6,1 à 6,4). Le pH du GGB est de 7,2.

. Il était d'autre part impossible d'utiliser les réactifs employés pour la technique classique sans dialyser les sérums car le tampon acide contient des phosphates qui précipitent en présence de chlorure de manganèse.

C'est ainsi que nous avons été amenés à recourir à l'utilisation d'un nouveau tampon : le tris-maléate pH 6,2.

. De plus les érythrocytes de poussin ont été remplacés par des globules rouges d'oie car la sédimentation des globules de poussin était très lente et parfois incomplète.

MATERIEL et METHODE

I/ Réactifs

a) Tampon tris-maléate : *

Solution A : Tris (hydroxy-méthyl-amino-méthane 0,2 M)..... 24,2 g
Anhydride maléique..... 16,6 g
H₂O QS p 1000 ml

Solution B : NaOH , 0,2 N

* tris est l'abréviation du produit chimique hydroxyméthyl-amino-méthane.

Pour obtenir une solution de tris-maléate, pH 6,2, on mélange :

- 250 ml de solution A
- 158 ml de solution B
- H_2O QS p 1000 ml

Le pH est ajusté au pH mètre

Nous utilisons ce tampon pour préparer la suspension érythrocytaire et pour diluer les antigènes de manière à obtenir 4 unités hémagglutinantes.

b) Tampon alcalin : (voir formule chapitre I)

Les dilutions des sérums sont faites avec un mélange à parts égales de tris-maléate et de tampon alcalin. (La sédimentation des globules rouges est plus rapide que si on utilise le tris-maléate comme seul diluant).

c) Solution d'héparine - $MnCl_2$

- Héparine (5000 U/ml) 1 part
- $MnCl_2$ (1 M en eau distillée) 1 part
- Tris-maléate 4 parts

d) Erythrocytes :

Globules d'oie adulte lavés dans du tampon GGB et remis en suspension à 50 % pour le traitement des sérums et à 0,25 % dans du tampon tris-maléate pour le titrage.

2/ Traitement des sérums

- 0,2 ml de sérum
- 0,6 ml de la solution d'héparine $MnCl_2$
- agitation puis incubation à + 4° C pendant 20 mn
- centrifugation à 2000 tr/mn pendant 10 mn
- décantation du surnageant. On ajoute 1,2 ml de tampon tris-maléate de manière à obtenir une dilution à 1/10.
- 0,2 ml de suspension érythrocytaire à 0,25 %
- incubation une heure à + 4° C
- centrifugation comme précédemment.

3/ Titrage des antigènes et inhibition de l'hémagglutination.

(voir schéma chapitre I)

RESULTATS

Nous avons comparé les titres obtenus après traitement des sérums par le kaolin d'une part et par l'héparine - $MnCl_2$ d'autre part.

Comme nous utilisons pour les sérums traités par l'héparine, un système globulaire différent de celui utilisé pour le titrage des sérums traités par le kaolin, nous avons parallèlement effectué quelques titrages de sérums après les avoir traités par le kaolin et absorbés par des globules d'oie dilués à

50 % dans du tampon acide. La technique de titrage utilisée était la même que celle décrite au chapitre I, mais en remplaçant la suspension de globules rouges de poussin par une suspension d'érythrocytes d'oie à 0,25 % dans du tampon acide.

Pour tous les sérums titrés, les résultats se sont révélés identiques.

I/ Titre de l'antigène rubéoleux

Le titre de l'antigène rubéoleux est différent selon que nous utilisons l'un ou l'autre système :

- tampon alcalin - globules rouges de poussin en tampon acide
- tampon tris-maléate (I/2 vo) tampon boraté (I/2 vol) et érythrocytes d'oie en tampon tris-maléate.

Exemple :- avec le système habituel I/64

- avec le système décrit dans ce chapitre I/8

2/ Titre de l'antigène de contrôle

Les titres obtenus avec les deux systèmes sont pratiquement identiques

Exemple : I/256 dans le premier cas

I/128 dans le second cas

(On sait qu'une différence d'une dilution n'est nullement significative).

3/ Titres des sérums

- Le tableau III présente les résultats obtenus après traitement des sérums d'une part par le kaolin et d'autre part par l'héparine en présence de chlorure de manganèse.

Nous avons choisi quelques sérums réagissant bien à l'action du kaolin : les titres obtenus avec les deux méthodes sont sensiblement les mêmes.

- Le tableau III bis montre les titres obtenus avec des sérums présentant encore des inhibiteurs non spécifiques après traitement par le kaolin.

Du fait de la petite quantité de sang que nous avons reçue, le volume de certains échantillons étant insuffisant, notre étude comparative n'a pu porter que sur 37 sérums.

- Dans 14 cas (indiqués par X sur le tableau) après traitement par l'héparine - $MnCl_2$ nous ne décelons plus d'inhibition de l'antigène de contrôle. Dans quelques cas seulement, la diminution du titre en anticorps rubéoleux semble correspondre à la perte des inhibiteurs non spécifiques (n° 7025 - I887 - I303 - 202 - 5852).

Par contre, dans tous les autres cas les titres restent sensiblement les mêmes.

- Dans 23 cas, nous trouvons une inhibition de l'hémagglutination de l'antigène Sindbis, quelle que soit la technique utilisée.

Cette inhibition est tantôt plus importante après traitement par le kaolin, tantôt plus importante après action de l'héparine- $MnCl_2$.

De nombreux auteurs ont montré que les inhibiteurs non spécifiques sont des β lipoprotéines.

Burstein et coll préconisent l'augmentation des doses d'héparine-MnCl₂ pour éliminer complètement les β lipoprotéines des sérums très lipémiques.

Nous avons essayé d'ajouter à 0,2 ml de sérum

- 0,15 ml d'héparine
- 0,15 ml de MnCl₂
- 0,3 ml de tris-maléate

Le titre en anticorps spécifiques rubéoleux reste inchangé, mais en aucun cas l'inhibition de l'hémagglutination de l'antigène de contrôle n'a pu être supprimée.

CONCLUSION :

Le traitement des sérums par l'héparine - MnCl₂ permet d'obtenir les mêmes résultats que le traitement classique par le kaolin lorsqu'il s'agit de sérums réagissant normalement au kaolin.

Dans quelques cas, les inhibiteurs non spécifiques décelés par l'antigène Sindbis disparaissent complètement des sérums qui posaient des problèmes particuliers. Mais ce résultat n'a pu être obtenu que dans 40 % environ des cas difficiles.

Il ne semble donc pas, d'après notre expérience que cette méthode soit vraiment préférable à la méthode classique.

- TABLEAU III -

N° des sérums	TRAITEMENT par le KAOLIN		TRAITEMENT par l'HEPARINE $MnCl_2$	
	rubéole	sindbis	rubéole	sindbis
807	I/60	0	I/60	0
4391	I/60	0	0	0
4700	I/I60	0	I/I60	0
4776	I/I60	0	I/I60	0
I23	I/80	0	I/80	0
4979	I/20	0	I/20	0
526	0	0	0	0
4995	I/320	0	I/320	0
58	I/I60	0	I/80	0
907	I/80	0	I/80	0

TABLEAU III (Bis)

ETUDE COMPARATIVE DES TITRES OBTENUS APRES TRAITEMENT DES SERUMS PAR LE
KAOLIN ET PAR L'HEPARINE $MnCl_2$.

Sérums conservant des inhibiteurs non spécifiques décelés par l'antigène Sindbis après traitement par le kaolin.

N° des sérums	TRAITEMENT PAR LE KAOLIN		TRAITEMENT PAR L'HEPARINE $MnCl_2$	
	rubéole	sindbis	rubéole	sindbis
* 4997	I/320	I/20	I/60	
4996	I/80	I/40	I/40	I/10
X 988	I/I/40	I/I0	I/40	0
9012	I/60	I/40	I/I60	I/40
7033	I/I60	I/I0	I/320	I/40
* 7025	I/80	I/40	I/I0	0
7001	I/80	I/20	I/I60	I/40
3651	I/I60	I/I0	I/320	I/I00
3610	I/I60	I/I0	I/80	I/20
3608	I/I280	I/I0	I/640	I/I0
3429	I/80	I/I0	I/80	I/40
I061	I/I60	I/I0	I/I60	I/40
* I035	I/80	I/I0	I/80	0
6212	I/80	I/40	I/80	I/40
4594	I/I60	I/40	I/80	I/40
* I893	I/240	I/I0	I/40	I/40
* I887	I/I60	I/20	I/40	0
* I521	I/20	I/20	I/I0	0
I328	I/320	I/20	I/640	I/40
* I303	I/I60	I/40	I/80	0
664	I/I0	I/I0	I/I0	I/I0
927	I/640	I/40	I/320	I/I0

.../

TABLEAU III bis (suite)

N° des sérums	TRAITEMENT PAR LE KAOLIN		TRAITEMENT PAR L'HEPARINE $MnCl_2$	
	rubéole	sindbis	rubéole	sindbis
I3I	I/I60	I/IO	I/I60	I/IO
II7	I/480	I/IO	I/480	I/IO
I29I	I/5I20	I/40	I/5I20	I/20
* I294	I/40	I/IO	I/40	0
7487	I/20	I/20	I/40	I/40
* 7200	I/IO	I/IO	I/IO	0
7202	I/I60	I/IO	I/80	0
* 7I28	I/80	I/20	I/40	0
7044	I/I20	I/IO	I/80	I/IO
664I	I/480	I/40	I/320	I/40
* 6I53	I/640	I/40	I/320	0
6639	I/640	I/40	I/640	I/IO
* 6I48	I/I60	I/40	I/80	0
* 6078	I/640	I/40	I/320	0
* 5852	I/320	I/40	I/80	0

- CHAPITRE III -

TRAITEMENT DES SERUMS PAR LE SULFATE DE DEXTRANE EN PRESENCE DE CHLORURE DE CALCIUM.

BURSTEIN et SAMAILLE ont montré qu'en présence de chlorure de calcium le sulfate de dextrane précipite sélectivement les β lipoprotéines des sérums.

LIEBHAER a utilisé cette technique pour la recherche des anticorps spécifiques de la rubéole. En comparant l'activité d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) des différentes fractions recueillies par chromatographie de deux échantillons d'un même sérum (l'un avant traitement, l'autre après précipitation des β lipoprotéines par le sulfate de dextrane CaCl_2) il a montré que cette méthode n'altérerait pas l'activité IHA des IgG, alors que les titres trouvés par inhibition de l'hémagglutination de l'antigène rubéoleux par les fractions correspondantes aux β lipoprotéines étaient considérablement abaissés.

Pour cet auteur, l'utilisation du sulfate de dextrane est préférable à l'emploi de l'héparine, car les résultats sont mieux reproductibles.

Nous avons essayé de traiter nos sérums posant des problèmes ainsi que quelques autres sérums, par le sulfate de dextrane en présence de CaCl_2 .

Du fait du faible volume des échantillons de sérum dont nous disposions, l'expérimentation n'a pu être réalisée qu'avec un certain nombre d'entre eux, et un seul essai a pu être fait par sérum.

MATERIEL ET METHODE

I/ Réactifs

1) Tampons : les tampons alcalin et acide décrits au chapitre premier.

2) Sulfate de dextrane (2000) solution à 10 % préparée en eau distillée.

3) Chlorure de calcium 1 M en eau distillée.

4) Erythrocytes de poussin

II/ Traitement des sérums

La technique décrite par BURSTEIN et SAMAILLE consiste à ajouter à 1 ml de sérum :

- 0,02 ml de sulfate de dextrane
- 0,10 ml de CaCl_2

Un précipité blanc apparaît immédiatement.

Dans certains cas (notamment sérums très lipémiques) ces auteurs conseillent de diluer de moitié les sérums avec de l'eau physiologique et de doubler les doses de sulfate de dextrane et de CaCl_2 .

La technique utilisée ici est la suivante :

- 0,5 ml de sérum
- 0,5 ml d'eau physiologique
- 0,02 ml de sulfate de dextrane
- 0,10 ml de CaCl_2
- incubation pendant 20 mn à + 4° C
- centrifugation à 6000 tr/mn à + 4° C pendant 10 mn
- le surnageant est décanté, puis dilué au 1/5 de manière à obtenir une dilution du sérum au 1/10.
- absorption par un excès d'érythrocytes de poussin à 50 %
- nouvelle centrifugation à 2000 tr/mn pendant 10 mn

III/ TITAGE

Le titrage est effectué selon la technique décrite au chapitre I.

RESULTATS

1) Sérums réagissant bien au traitement par le kaolin

4 sérums ont été traités : dans trois cas, les titres obtenus sont peu différentes de ceux obtenus après traitement par le kaolin ; (voir tableau IV)..

2) 7 Sérums présentant des inhibiteurs non spécifiques

décelés par l'antigène Sindbis après traitement par le kaolin ont été titrés après action du sulfate de dextrane- CaCl_2 .

Dans un cas seulement, on voit disparaître l'inhibition de l'héماغglutination de l'antigène de contrôle (sérum n° 7I28). Ailleurs l'inhibition du Sindbis atteint des titres de 1/80 ou plus encore, alors que l'héparine MnCl_2 avait fait disparaître complètement cette inhibition.

Nous n'avons pas pu essayer de modifier les dosages des réactifs du fait de la quantité insuffisante de sérum dont nous disposions.

Il ne nous est donc pas possible de connaître les limites de cette méthode.

.../

TABLEAU IV

TRAITEMENT DES SERUMS PAR LE SULFATE DE DEXTRANE EN PRESENCE DE CHLORURE DE CALCIUM.

N° des sérums	TITRES OBTENUS après TRAITEMENT par le SULFATE de DEXTRANE CaCl_2		TITRES OBTENUS après TRAITEMENT par KAOLIN	
	rubéole	sindbis	rubéole	sindbis
4594	I/I60	I/40	I/320	0
4990	I/240	0	I/320	0
5095	I/80	0	I/I60	0
5344	I/40	I/I0	I/320	0
* 6148	I/I60	I/320	I/I60	I/40
* 7128	I/40	I/I0	I/80	I/20
* 1521	I/I0	I/640	I/40	I/I0
* 119	I/80	I/I60	I/640,	0 $\pm$ I/I0
* 334	I/40	I/I60	I/20	I/I0
* 7125	I/20	I/320		
* 927	I/320	I/320	I/320	I/20

* Sérums conservant des inhibiteurs non spécifiques après traitement par le kaolin.

- CHAPITRE IV -

TRAITEMENT PAR L'ETHER - ALCOOL

La technique de délipidation des sérums par l'ether-alcool à très basse température (- 70° C) décrite par DELSAL a été appliquée à la recherche d'anticorps spécifiques de la rubéole.

MATERIEL et METHODE

I/ Réactifs

- a) tampons : tampons alcalin et acide déjà décrits.
- b) Erythrocytes de poussin dilués en tampon phosphate

II/ Traitement des sérums

- a) - à 1 ml de sérum on ajoute :
 - 10 ml d'ether anesthésique
 - 0,5 ml d'alcool à 90° GL
- b) Congélation : ce mélange est plongé dans un bain réfrigérant (acétone + neige carbonique) pendant 10 mn.

On pratique une agitation continue pendant toute la congélation.
- c) Décongélation lente dans un bain d'eau glacée. 3 congélations et décongélation sont faites successivement ; on observe un léger trouble du sérum.
- d) Centrifugation de manière à bien séparer les deux phases.
- e) Décantation de la phase étherée. Le sérum est recueilli puis on fait passer un courant d'azote pour enlever toute trace d'ether. Le sérum est ensuite dilué au 1/10 et absorbé par un excès d'érythrocytes de poussin à 50 %.

III/ Titrage : effectué selon la technique décrite au chapitre premier.

RESULTATS :

- 10 sérums réagissant normalement au traitement par le kaolin ont été traités par l'ether-alcool.

Dans 8 cas sur 10, les titres sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus après traitement par le kaolin. On note cependant le plus souvent une légère baisse du titre : 1/2 à 1 dilution (valeur non significative).

- Ce traitement a aussi été appliqué à 9 sérums présentant une inhibition de l'héماغglutination de l'antigène de contrôle après traitement par le kaolin. Bien entendu, le traitement ether-alcool, comme dans les cas précédents, a été appliqué à des sérums vierges.

.../

Dans 8 cas sur 9, cette inhibition disparaît complètement après action de l'éther-alcool.

Dans 7 cas (sérum n°s 4594 - I893 - 927 - I328 - 62I2 - 365I), les titres en anticorps spécifiques diminuent. Cette baisse de titre semble correspondre à la disparition de l'inhibition de l'hémagglutination de l'antigène de contrôle.

Dans 2 cas, il n'y a pas de baisse de titre des anticorps spécifiques.

- Nous connaissons les résultats obtenus par titrage de trois de ces sérums avant tout traitement.

N° des sérums	avant trait.		Kaolin		Héparine		Ether-alcool	
	R	S	R	S	R	S	R	S
I328	960--640		320--40		640--40		40--10	
II9	80--640		80--40		nf nf		40--0	
I035	160--40		40--40		80--10		40--0	

Dans le premier cas (n° I328), la disparition de l'inhibition de l'hémagglutination du Sindbis s'accompagne d'une très importante baisse du titre en anticorps (3 dilutions).

Dans le deuxième cas (n° II9), les titres sont peu différents quelle que soit la technique employée.

Dans le troisième cas (n° I035), les titres en anticorps spécifiques sont les mêmes, bien que le traitement par le kaolin laisse persister une inhibition de l'hémagglutination de l'antigène de contrôle.

CONCLUSION :

Là encore nous n'avons pu appliquer cette méthode à d'autres sérums en raison du volume nécessaire.

Malgré le nombre relativement faible de sérums examinés, nous pensons pouvoir dire que le traitement par l'éther-alcool semble efficace :

- d'une part, les titres en anticorps obtenus avec des sérums courants sont pratiquement les mêmes qu'après action du kaolin.

- d'autre part, dans la plupart des cas, nos sérums posant des problèmes n'inhibent plus l'hémagglutination de l'antigène Sindbis et nous notons une baisse du titre des anticorps spécifiques qui le plus souvent semble liée à cette disparition de l'inhibition de l'antigène témoin.

Dans certains cas, la diminution du titre en anticorps spécifiques est très importante. Est-elle due uniquement à la disparition des inhibiteurs non spécifiques, ou bien le traitement par l'éther-alcool abaisse-t-il le taux des protéines du sérum ?

Cette question sera envisagée au chapitre suivant, ainsi que la nature des inhibiteurs non spécifiques.

- TABLEAU V -

TRAITEMENT PAR L'ALCOOL - ETHER.

COMPARAISON AVEC LES RESULTATS OBTENUS APRES TRAITEMENT PAR LE KAOLIN.

N° des sérums	TRAITEMENT PAR LE KAOLIN		TRAITEMENT PAR L'ETHER-ALCOOL	
	rubéole	sindbis	rubéole	sindbis
5180	I/480	0	I/320	0
4708	I/I60	0	I/I20	0
4943	I/320	0	I/I60	0
5133	I/I60	0	I/20	0
3672	I/320	0	I/320	0
7044	I/640	0	I/320	0
3599	I/I280	± I/10	I/640	0
I477	I/640	0	I/I280	± I/10
I407	I/20	0	I/20	0
8440	I/640	± I/10	I/640	± I/10
* 4594	I/40	I/10	I/20	0
* I893	I/20	I/20	I/10	0
* 927	I/320	I/10	I/I60	0
* 3651	I/40	I/40	0	0
* 3428	I/40	I/20	I/10	0
* IO35	I/40	I/40	I/40	0
* II9	I/80	I/40	I/40	0
* 6212	I/80	I/40	I/20	± I/10
* I328	I/320	I/40	I/40	I/10

* SERUMS PRESENTANT ENCORE DES INHIBITEURS NON SPECIFIQUES APRES TRAITEMENT PAR LE KAOLIN.

- CHAPITRE V -

ETUDE DES PROTEINES DU SERUM AVANT ET APRES TRAITEMENT PAR L'ETHER-ALCOOL.

Le traitement des sérums par l'éther-alcool a fait disparaître l'inhibition de l'héماغglutination de l'antigène Sindbis, alors que celle-ci persistait dans certains cas après traitement par le kaolin. Parallèlement, il y avait une baisse du titre des anticorps spécifiques. Nous avons essayé de savoir si cette baisse de titre était due à la disparition des inhibiteurs non spécifiques de ces sérums, ou bien s'il s'agissait d'une modification du taux des immunoglobulines.

Pour pallier l'inconvénient du faible volume de la plupart de nos échantillons de sérum, nous avons été amenés pour réaliser cette étude à effectuer deux mélanges de sérums :

1) Mélange A : composé de sérums présentant une inhibition de l'héماغglutination de l'antigène de contrôle après traitement par le kaolin.

2) Mélange B : il provient de la réunion de plusieurs sérums réagissant normalement à l'action du kaolin.

(Les échantillons utilisés pour ces deux mélanges n'ont jamais subi de traitement).

Plusieurs opérations ont été effectuées dans le but de connaître la nature des inhibiteurs non spécifiques et de voir si l'action de l'éther-alcool dénaturait les immunoglobulines.

A) Recherche de l'inhibition de l'héماغglutination des antigènes rubéoleux et Sindbis par les mélanges A et B.

- avant traitement

- après traitement d'une part par le kaolin

d'autre part par l'éther-alcool.

B) Chromatographie sur colonne échangeuse d'ions du mélange A, avant et après action de l'éther-alcool, titrage des fractions Etude des composants séparés par chromatographie.

C) Immunoelectrophorèse et double diffusion en gel

(Etude du mélange A et du mélange B avant traitement et après action de l'éther-alcool - phase aqueuse et phase éthérée).

D) Dosages des immunoglobulines de chacun des deux mélanges avant et après traitement par l'éther-alcool.

MATERIEL et METHODEA) TITRAGES DES MELANGES A ET B

Tous les titrages sont effectués selon la technique décrite au chapitre I (On utilise l'antigène rubéoleux et l'antigène Sindbis, les érythrocytes sont des érythrocytes de poussin dilués à 0,30 % dans du tampon acide).

.../

a) le mélange B non traité

On dilue 0,2 ml de sérum au I/10 et on absorbe les hémagglutinines non spécifiques par 0,2 ml de suspension érythrocytaire à 50 % .

b) les mélanges A et B après traitement par le kaolin 0,2 ml de sérum (technique décrite au chapitre I).

c) les mélanges A et B après action de l'éther-alcool

- 6 ml de sérum
- 60 ml d'éther
- 3 ml d'alcool à 90 ° GL

On pratique ensuite 3 congélations et décongélations successives, puis on centrifuge et on sépare les deux phases ;

On prélève 0,2 ml de la phase sérique. Dilution au I/10.

Absorption des hémagglutinines non spécifiques.

Le reste de la phase aqueuse et la phase éthérée sont conservés pour d'autres études.

B) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DEALE-CELLULOSE.

(selon SOBER et coll).

Les protéines du mélange A sont séparées par chromatographie avant et après action de l'éther.

On dispose pour chaque chromatographie de 1 ml de sérum dialysé en tampon phosphate 0,01 M pendant une nuit à 4° C.

- Préparation d'une colonne de chromatographie de 10 cm de hauteur sur 1 cm de diamètre.

- Dépôt de 1 ml de sérum dialysé

- élution par le tampon phosphate 0,01 M pH 7,1 puis par du tampon phosphate 0,02 M pH 7,1, enfin par du tampon phosphate 0,02 M auquel on ajoute un gradient du chlorure de sodium 0,5 M de manière à obtenir un gradient de force ionique.

L'élution est mesurée en lumière UV à 260 mn

Les fractions de 5 ml sont recueillies dans des tubes réfrigérés, et conservées à + 4° C jusqu'au moment du titrage.

Pour chacune d'entre elles, on recherche une éventuelle inhibition de l'hémagglutination de l'antigène rubéoleux et de l'antigène Sindbis.

C) IMMUNOELECTROPHORESE :

(technique de GRABAR)

I) Réactifs

- | | | |
|-----------------|----------------------|---------|
| - tampon pH 8,6 | barbitalsodique | 20,6 g |
| | barbitol acide | 3,7 g |
| | H ₂ O Qsp | 1000 ml |
| | | .../ |

- colorant amido-schwartz 0,50 g
 acide acétique 50 ml
 alcool absolu QS p 500 ml

- agarose à 1 % agarose 1 g
 eau distillée 50 ml

On porte le mélange au bain-marie à + 100° C. Il devient transparent.

On ajoute du tampon barbital : 50 ml

Puis la préparation est filtrée et ramenée à 45 ° C.

2) Préparation des lames

Les lames sont nettoyées à l'alcool puis passées à la flamme.

Elles sont fixées sur leur support avec un peu d'agarose/

On dépose 17 ml d'agarose pour 3 lames de manière à obtenir une épaisseur de gel suffisante.

Les trous et les rigoles sont tracés à l'emporte pièce selon le schéma ci-dessous.

Les trous sont creusés et remplis par les sérums à étudier.

Le porte-lames est placé dans une cuve à électrophorèse pendant 1 H 30. Courant de 160 mV.

Après migration des protéines, les rigoles sont creusées et remplies avec l'immunsérum choisi; puis le porte-lames est placé pendant 36 H. en atmosphère humide.

Ensuite les lames sont lavées pendant 6 H. en eau physiologique, recouvertes d'un papier buvard et séchées à 37 °C.

Coloration

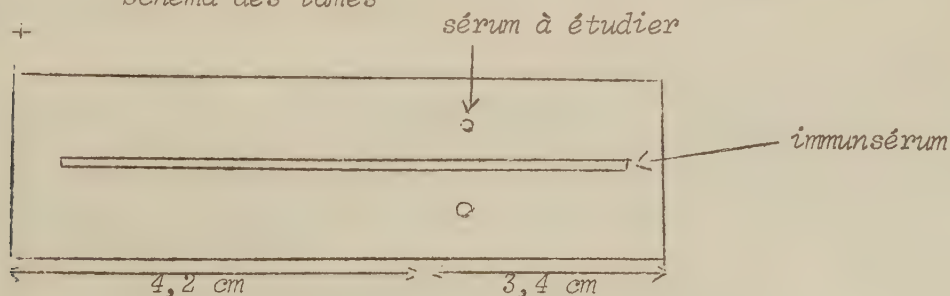
eau distillée pendant 8 mn

colorant pendant 20 mn

décoloration par l'acide acétique 10 mn

les lames sont placées dans un bac contenant de l'eau du robinet jusqu'à décoloration complète du fond de gélose.

Schéma des lames



2) On a étudié par immunoelectrophorèse :

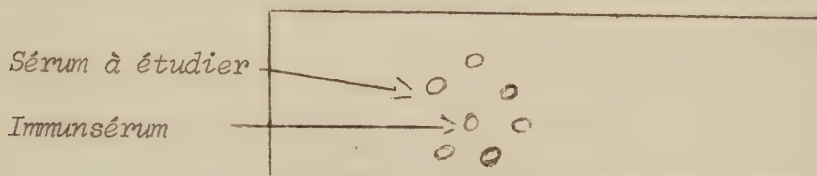
- a) des échantillons des mélanges A et B avant traitement.
- b) des échantillons des mélanges A et B après action de l'éther-alcool.
- c) les phases éthérées provenant du traitement de chacun des deux mélanges. Celles-ci ont été préalablement dialysées en eau physiologique tamponnée pendant plusieurs jours à + 4° C puis concentrées 10 fois par action du polyéthylène glycol 20 M. Chaque échantillon a été mis en présence d'un immunosérum anti sérum humain total et d'un immunosérum anti β lipoprotéines.

d) DOUBLE DIFFUSION EN GELOSE

d'après la technique de OUCHTERLONY.

I) Technique utilisée

Les plaques recouvertes de gel d'agarose sont préparées de la même manière que pour l'immunoélectrophorèse. Les trous sont creusés selon le schéma ci-dessous :



Le trou central reçoit l'immunosérum ; les trous périphériques les sérums ou les fractions (séparées par chromatographie) à étudier.

Les lames sont placées en atmosphère humide pendant 48 H. puis elles sont lavées, séchées et colorées selon la technique décrite au chapitre précédent.

2) La double diffusion a été effectuée avec :

- des échantillons des mélanges de sérums A et B avant traitement.
- des échantillons de ces mêmes mélanges après action de l'éther-alcool.
- les phases éthérées provenant de ce traitement après dialyse et concentration.

Pour chaque échantillon, on a fait une double diffusion avec un sérum anti β lipoprotéines, un sérum anti α_1 lipoprotéines et avec un sérum anti α_2 lipoprotéines.

De plus, les fractions 2, 3 et 4 d'une part, 47, 48 et 49 d'autre part, enfin 56, 57, 58, obtenues par chromatographie du mélange A avant et après action de l'éther-alcool, ont été dans chaque cas concentrées sous un volume de 1 ml et étudiées par double diffusion en gel en présence d'immunosérums anti sérum humain total, anti IgG, anti IgM et anti β lipoprotéines.

E) ETUDE QUANTITATIVE DES IMMUNOGLOBULINES

Cette étude a été faite au laboratoire de Monsieur PILLOT d'après la technique décrite par MANCININ, CARBONARA et HEREMANS.

Principe : Lorsqu'on fait diffuser un antigène de concentration déterminée à partir d'un trou creusé dans une plaque de gélose dans laquelle a été incorporé l'anticorps correspondant (et ce pendant un temps suffisant pour permettre à la totalité de l'antigène de se combiner à l'anticorps) la taille du précipité obtenu est directement proportionnelle à la quantité d'antigène utilisée et indirectement proportionnelle à la concentration en anticorps.

Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est variable selon le système employé.

Pour doser un antigène, il suffit d'établir auparavant une droite étalon. On utilise pour cela un immunosérum convenablement dilué, et plusieurs échantillons d'antigène de concentrations différentes.

On utilise pour tracer la droite un papier semi-logarithmique et on porte sur l'échelle arithmétique la dimension des précipités et sur l'autre échelle les concentrations. Il est alors facile de déterminer la quantité de l'antigène à doser à partir de la dimension du précipité obtenu avec cet antigène, l'expérience étant faite dans les mêmes conditions.

Les plaques de gélose utilisées pour effectuer cette diffusion sont des immunoplaques de HYLAND.

Les lectures sont faites après 6 h à 37° C pour les IgG

16 à 24 H à la température du laboratoire
pour les IgA et les IgM.

Concentrations utilisées pour établir les droites étalons

IgG	110 mg/100 ml
	30 mg/100 ml
	9,5 mg/100 ml
	3,5 mg/100 ml

IgA	50 mg/100 ml
	22 mg/100 ml
	10,5 mg/100 ml
	6 mg/100 ml

IgM	39 mg/100 ml
	13 mg/100 ml
	5,2 mg/100 ml
	3,6 mg/100 ml

imprécision 15 à 20 %.

RESULTATS

A) ETUDE DE L'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION des antigènes rubéoleux et Sindbis par les mélanges A et B avant traitement et après action de l'éther-alcool :

a) Mélange A

	rubéole	Sindbis
Kaolin	I/320	I/40
Ether-alcool	I/80	0
Ether-alcool puis Kaolin	I/80	0

b) Mélange B

Sans traitement	I/640	I/640
Kaolin	I/I60	0
Ether-alcool	I/I60	0
Ether-alcool puis Kaolin	I/I60	0

D'après ce tableau :

I/ On constate que les titres en anticorps spécifiques obtenus après traitement par le kaolin ou après action de l'éther-alcool sont les mêmes pour les mélanges B (mélange de sérums réagissant normalement au traitement par le kaolin).

On ne décèle pas d'inhibition de l'hémagglutination de l'antigène Sindbis, quelle que soit la méthode utilisée pour tenter d'éliminer les inhibiteurs non spécifiques de ce mélange de sérums.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au chapitre précédent.

Donc le traitement par l'éther-alcool semble bien enlever les inhibiteurs non spécifiques sans modifier les anticorps.

2/ Dans le cas du mélange A

- le traitement par le kaolin laisse persister une inhibition de l'hémagglutination de l'antigène de contrôle.

- le traitement par l'éther-alcool supprime cette inhibition tandis que nous observons un abaissement de deux dilutions du titre de ce mélange vis-à-vis de l'antigène spécifique.

Là encore les résultats sont en accord avec ceux trouvés précédemment.

Cette baisse de titre correspond elle à la disparition des inhibiteurs non spécifiques, ou bien doit-on penser que l'éther-alcool altère les immunoglobulines ?

C'est ce que nous avons tenté de savoir en passant sur colonne de DEAE-cellulose le mélange A avant et après traitement par l'éther-alcool.

B) RESULTATS OBTENUS PAR GHROMATOGRAPHIE DU MELANGE A

avant et après action de l'éther-alcool. (voir tableaux)

Dans les deux cas, la chromatographie a permis de séparer 3 pics :

- le premier pic a dans les deux cas la même valeur.
- par contre le troisième pic a une amplitude et une surface moins importantes après action de l'éther-alcool.

1) Etude des protéines contenues dans les fractions composants ces pics

IgG : la double diffusion en gel en présence d'immunsérums spécifiques montre que le premier pic est composé uniquement d'IgG.

On trouve aussi des IgG (mais les lignes de précipitation sont beaucoup moins nettes) dans les fractions 47, 48, 49 dans les deux cas. D'ailleurs on remarque que la ligne de précipitation est encore un peu moins nette après traitement. Les IgG sont également présentes dans les fractions 56, 57 et 58 avant traitement.

IgM : La double diffusion en gel révèle la présence d'IgM dans les fractions 47, 48, 49 dans les deux cas et dans les fractions 56, 57, 58 seulement après traitement.

B) Lipoprotéines : elles sont retrouvées uniquement dans les fractions 56, 57, 58, après traitement.

Albumines : Fractions 56, 57, 58 dans les deux cas et moins nettement dans les fractions 47, 48, 49.

2) Réaction d'inhibition de l'hémagglutination effectuée sur les fractions séparées par chromatographie

a) L'examen des fractions formant le premier pic a montré que l'on observe une inhibition de l'hémagglutination de l'antigène rubéoleux dans les deux cas (avant et après traitement du mélange A par éther-alcool).

Par contre, il n'y a pas d'inhibition de l'hémagglutination de l'antigène témoin.

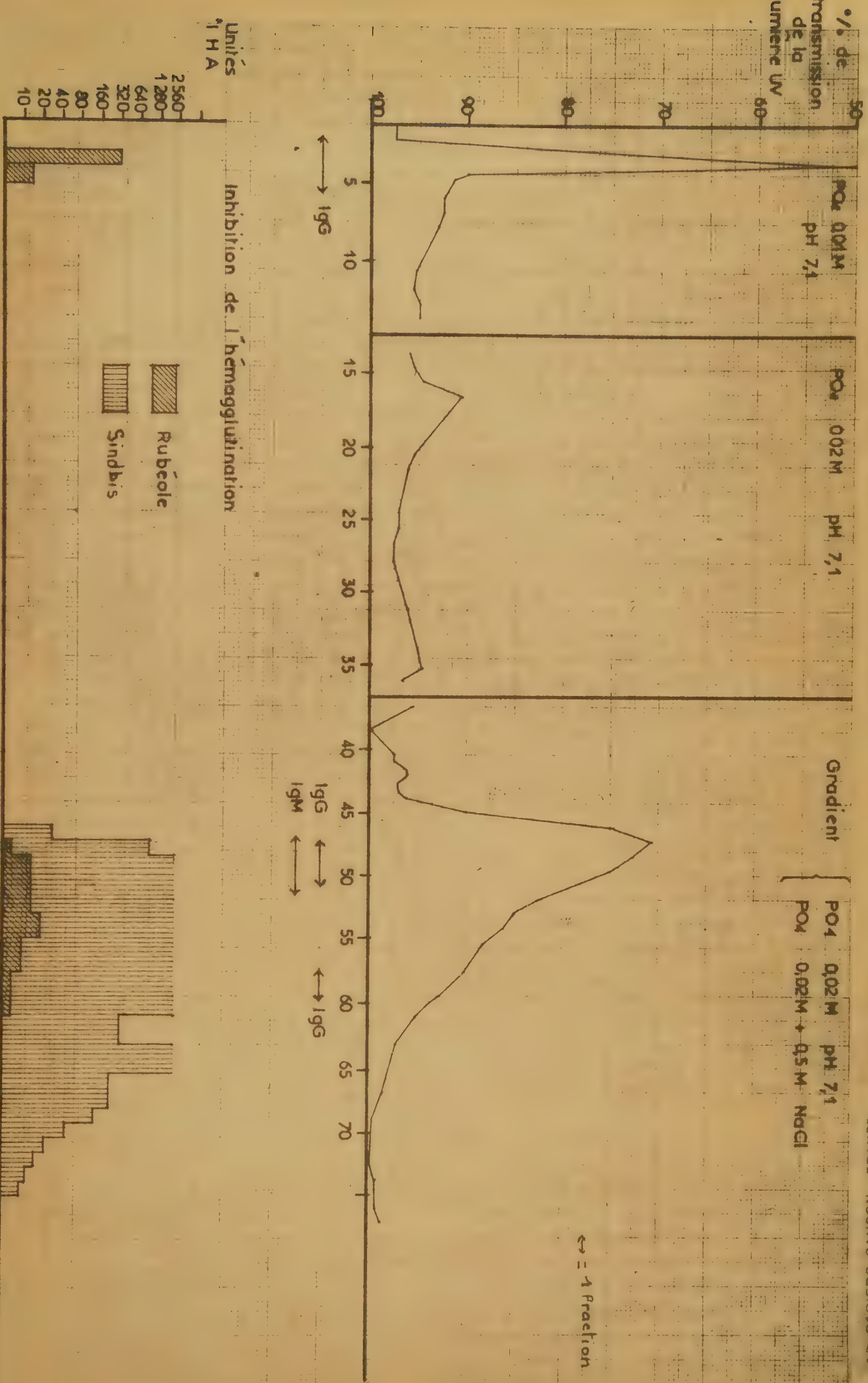
Ces résultats sont bien les résultats espérés puisque les fractions correspondant au premier pic ne contiennent que des IgG. Remarquons d'autre part que les titres obtenus sont identiques.

3) Etude des fractions correspondant au troisième pic

Avant traitement, on observe une inhibition de l'hémagglutination des deux antigènes.

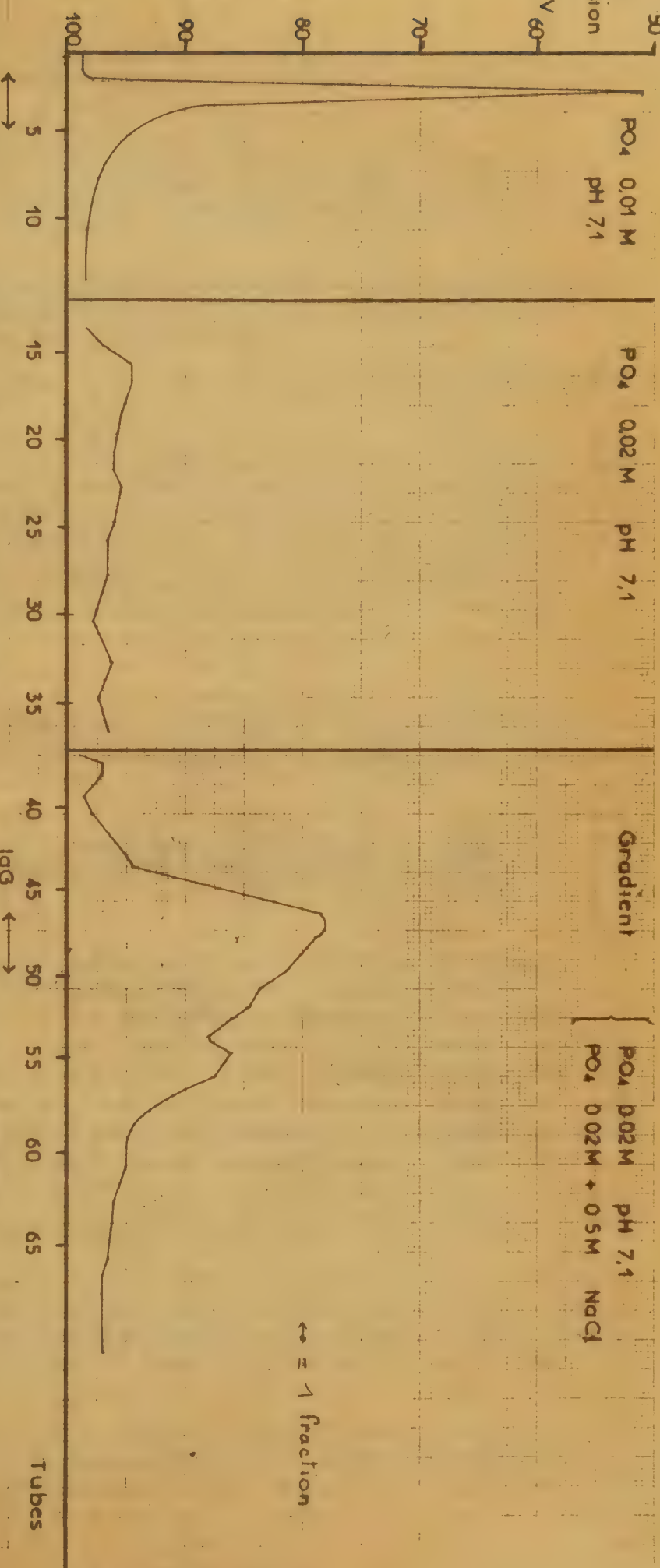
Par contre après action de l'éther-alcool, cette inhibition disparaît complètement.

Les titres obtenus avec l'antigène Sindbis sont plus élevés qu'avec l'antigène rubéoleux ; et le nombre de fractions inhibant l'hémagglutination de l'antigène de contrôle est plus important que le nombre de fractions inhibant l'hémagglutination de l'antigène spécifique.



MELANGE A AVANT TRAITEMENT

% de transmission de la lumière UV



Unités I. H-A



Rubéole

Nous avons vu (chapitre 1) que dans la plupart des cas, l'antigène Sindbis est plus sensible aux inhibiteurs non spécifiques que l'antigène rubéoleux.

Mais d'autre part, les fractions 47, 48, 49 contiennent apparemment des IgG en quantité plus grande avant traitement qu'après action de l'éther. Il faut toutefois remarquer qu'il s'agit là de déterminations purement qualitatives.

L'inhibition de l'héماغglutination de l'antigène rubéoleux par ces fractions correspond-elle à la présence d'IgG ou à la présence d'inhibiteurs non spécifiques auxquels l'antigène serait plus sensible ?

Nous n'avons pas le possibilité pour l'instant de répondre à cette question.

Enfin nous n'avons pas pu mettre en évidence par immunoélectrophorèse la présence de B lipoprotéines dans le troisième pic séparé par chromatographie du mélange A avant et après traitement (sauf peut-être à l'état de traces), mais il faut noter que les chromatographies ont été faites chaque fois à partir de 1 ml de sérum et que dans ce cas, la concentration en B lipoprotéines de chaque fraction est peut-être insuffisante pour que celles-ci puissent être révélées par de simples méthodes immunochimiques.

Une question reste posée :

La persistance de l'inhibition de l'héماغglutination de l'antigène de contrôle après traitement par le kaolin est-elle due à la présence d'inhibiteurs non spécifiques différents des B lipoprotéines et disparaissent après action de l'éther-alcool ?

C) ETUDE DES MELANGES A et B PAR IMMUNOELECTROPHORESE ET PAR DOUBLE DIFFUSION EN GELOSE AVANT ET APRES ACTION DE L'ETHER-ALCOOL. ETUDE DE LA PHASE ETHEREE.

Nous appellerons A₁ et B₁ les échantillons des mélanges de sérums A et B avant traitement.

A₂ et B₂ les échantillons obtenus après action de l'éther-alcool.

A₃ et B₃ les phases éthérées dialysées et concentrées.

I- La double diffusion en gel révèle la présence de B lipoprotéines en A₁ et B₁. Nous en retrouvons aussi en A₂ et B₂ (mais là, les lignes de précipitation sont beaucoup moins nettes).

Le même phénomène se retrouve pour les α 1 lipoprotéines et pour les α 2 glycoprotéines.

Par contre, aucun arc de précipitation n'a pu être décelé en A₃ et B₃ ce qui peut s'expliquer soit par une dénaturation des protéines, soit simplement par des concentrations trop faibles pour être révélées par des méthodes immunochimiques.

2- Les immunoélectrophorèses révèlent les mêmes lignes de précipitations pour A₁ et A₂. De même B₁ et B₂ présentent la même image après immunoélectrophorèse. Dans ces deux cas, l'immunsérum utilisé est un sérum anti-sérum humain total).

/...

Par contre, on n'a pas mis en évidence de lignes de précipitation en A_3 et B_3 dans les mêmes conditions.

En résumé, le traitement par l'éther-alcool enlève apparemment une partie des β lipoprotéines, des α_1 lipoprotéines et peut être des α_2 glycoprotéines. Mais l'image immunoélectrophorétique reste, qualitativement du moins, la même.

D) ETUDE QUANTITATIVE DES IMMUNOGLOBULINES

Les résultats des dosages sont les suivants :

	IgG (mg / ml)	IgA (mg / ml)	IgM (mg / ml)
A_I (sérum non traité)	29	3,2	0,64
A_2 (sérum traité)	21	2,4	0,94
A_3 (extrait étheré)	0	0	0
B_I (sérum non traité)	5,6	1,5	1,2
B_2 (sérum traité)	11	1,5	0,64
B_3 (extrait étheré)	0	0	0

On remarque les points suivants :

1°) Là encore, en accord avec les résultats obtenus par immunoélectrophorèse, on ne retrouve pas d'immunoglobulines dans les extraits étherés.

2°) Le taux des IgG du mélange A est très élevé. (augmenté trois fois par rapport à la normale).

On note pour ce mélange une légère baisse des IgG et des IgA et une augmentation des IgM qui peut peut-être s'expliquer par une dépolymérisation des IgM par l'éther.

Ces résultats sont difficiles à interpréter du fait de l'imprécision relative de la méthode de dosage.

3°) Le mélange B (avant traitement) est relativement pauvre en IgG.

Après traitement, on note une augmentation du taux des IgG, une baisse des IgM tandis que le taux des IgA reste le même. Dans ce cas également, l'interprétation des résultats est difficile.

Il est à noter qu'un dosage des protéines, pratiqué suivant la technique de Lowry révèle une faible quantité de protéines dans les phases étherées A_3 et B_3 , comme il apparaît ci-dessous :

A_3	0,23 mg/ml
B_3	0,1 mg/ml

.../

EN CONCLUSION :

Les résultats obtenus par titrage de deux mélanges de sérums après traitement par le Kaolin et par le kaolin et par l'éther-alcool, ainsi que la chromatographie du mélange A avant et après traitement semblent montrer que l'éther-alcool n'enlève pas d'anticorps spécifiques.

Les immunoélectrophorèses ne montrent pas en ce qui concerne les protéines du sérum de différence quantitative avant et après traitement.

Malheureusement, là encore notre expérience a été limitée par la quantité disponible de sérum.

- CONCLUSIONS GENERALES -

La spécificité de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination dans la rubéole est d'une importance capitale.

1°) *Le traitement habituel des sérums par le kaolin laisse subsister chez un petit nombre d'entre eux des inhibiteurs non spécifiques à des titres généralement faibles.*

Cependant la confusion possible avec les anticorps spécifiques est d'autant plus à redouter qu'un titre faible de ceux-ci (1/20) suffit à affirmer la protection dans le cas d'une femme enceinte ayant subi un contact suspect.

2°) *Nous avons essayé, le traitement par l'héparine en présence de chlorure de manganèse des sérums réfractaires au traitement par le kaolin :*

Dans 14 cas sur 37 nous voyons disparaître complètement l'inhibition de l'hémagglutination de l'antigène témoin (Sindbis).

Le titre des anticorps est sensiblement abaissé, ou reste pratiquement identique au titre obtenu après traitement par le kaolin.

3°) *L'utilisation de l'éther-alcool, à très basse température, a permis d'éliminer complètement l'inhibition non spécifique dans 8 cas sur 9. Mais les titres obtenus avec l'antigène rubéoleux sont, dans 7 cas, abaissés de 1 à 2 dilutions par rapport aux titres obtenus après action du kaolin.*

4°) *Une étude portant sur 10 sérums réagissant bien au kaolin permet de voir que les titres en anticorps spécifiques sont identiques après traitement par le kaolin et après action de l'éther-alcool.*

L'examen de deux mélanges, l'un composé de sérums inhibant l'hémagglutination de l'antigène Sindbis, l'autre de sérums normaux, confirme ces résultats.

5°) a- L'immunoélectrophorèse de ces deux mélanges montre que l'image immunologique reste qualitativement la même avant et après action de l'éther-alcool. La double diffusion en gel montre cependant une diminution des β lipoprotéines dans les sérums traités.

b- Les dosages des immunoglobulines ont montré des résultats un peu discordants, mais la technique utilisée pour ces dosages s'est par ailleurs révélée imprécise.

c- Enfin, la chromatographie du mélange A (sérums conservant leurs inhibiteurs non spécifiques après action du kaolin) montre que les anticorps inhibant l'héماغglutination portés par les IgG ont la même valeur avant et après traitement par l'éther-alcool, alors que les fractions inhibant l'héماغglutination du Sindbis perdent cette activité après traitement par l'éther-alcool.

6°) Le traitement des sérums par l'éther-alcool nous paraît donc recommandable dans les rares cas où le kaolin laisse persister des inhibiteurs non spécifiques.

7°) Enfin, l'ensemble de ce travail semble confirmer l'avantage apporté par l'utilisation de l'antigène Sindbis pour attester la spécificité du diagnostic de la rubéole par inhibition de l'héماغglutination, et cela, quelle que soit la méthode utilisée pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques des sérums à étudier.

oooooooooooo

- BIBLIOGRAPHIE -

- 1) BURSTEIN M. et SAMAILLE J. - Dosage des lipoprotéines sériques après précipitation sélective par l'héparine (Presse Médicale 1958 . 43 . 974).
- 2) BURSTEIN M. et SAMAILLE J. - Sur une nouvelle méthode de dosage du cholestérol lié aux lipoprotéines du sérum (Clin . Chim . Acta . 1958 . 3 . 230).
- 3) CABASSO V.J. , LOUIE R.E. , HOK K.A. , ROBINSON C.I. , DAVIS P.C. , MINER R.C. - Loss of Rubella Antibody from Immune Globulin Treated with Kaolin. (Appl. Microbiol. 1969 . 18 . 410).
- 4) CLARKE D.H. , CAZALS J. - Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Test with Arthropod-borne Viruses. (Amer . J . Trop . Med. Hyg . 1958 . 207 . 561).
- 5) COOPER Z. , MATTERS B. , ROSENBLUM J.K. , KRUGMAN S. - Expérience with a Modified Rubella Hemagglutination Inhibition Antibody Test . (J . A. M. A . 1969 . 207 . 89 .)
- 6) DELSAL J.L. - Délipidation par l'éther à très basse température. Rupture des cénapses cholestéroprotéidiques du sérum. Résistance des cénapses phosphatidiques. Influence de cette délipidation sur le rapport albumine sur globulines. (Bull . Soc . Chim . Biol . 1949 . 31 . 122)
- 7) DELSAL J.L. , PEREZ J.L. , LAPORTE R. - Influence de la délipidation des immunosérums sur leur activité sérologique . (Bull. Soc. Chim . Biol . 1950 . 62 . 219 .)
- 8) FLODIN P. , KILANDER J. - Fractionation of Human Serum Prot by Gel filtration . (Biochem . Biophys . Acta . 1962 . 63 . 403 .)
- 9) GRABAR P. - Immuno-electrophoretic analysis . (Meth . Biochem . Anal 7 . I .)
- 10) HALOONEN P.E. , RYAN JM. , STEWART J.A. - Rubella Hemagglutinine , Prepared with Alkaline Extraction of Virus Grown in Suspension of BHK-21 Cells . (Proc . Soc . Exp . Biol . Med . 1967 . 162 .)
- 11) LIEBHAVER H.H. - Characteristic of an improved HAI Test Employing a new Method for the Removal of non Immunoglobulin HA Inhibitors from Serum. (J. Immunology . 1970 . 104 . 826 .)
- 12) LEERHØY J. Cytopathie . Effect of Rubella Virus in Rabbit Cornea Cell Line . (Science . 1965 . 149 . 633 .)
- 13) MANCINI G. , CARBONARA A.O. , HEREMANS J.F. - Immunological . Quantitation of Antigens by Single Radial Immunodiffusion . (Immuno chem. 1965 . 2 . 235 .)

- 14) MAURIN J. *Le virus de la rubéole* (Bull. Inst. Pasteur 1969 . 67. 483)
- 15) MAURIN J. *Epidémiologie et dépistage de la rubéole*; (Le Pharmacien Biol. 1970. 6. 301)
- 16) NORRBY E. *Hemagglutination by Measles Virus. A Simple Procedure for production of High Potency Antigen for Hemagglutination-Inhibition (H.I.)* (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962. III. 814)
- 17) PETERSON E.A., SOBER H.A. - *Chromatography of Proteins I. Cellulose Ion-exchange Adsorbants* (J. Amer. Chim. Soc. 1956. 78 . 751)
- 18) SOBER H.A., CUTTER F.J., WICKOFF M.M., PETERSON E.A. *Chromatography of Proteins II . Fractionation of serum Protein on an Anion-exchange Cellulose.* (J. Amer. Chim. Soc. 1956 . 78 . 756)
- 19) STEWART G.L. , PARKMAN P.D., HOPPS H.E. , DOUGLAS R.D. HAMILTON J.P. MEYER H.M. - *Rubella-virus Hemagglutination - Inhibition Test.* (New. Engl. J. Med. 1967 . 276 . 554. °
- 20) STOKER M. , MACPHERSON I. - *Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK 21 and its Derivatives .* (Nature. 1964 . 203 . 1355 .)
- 21) VAERMAN J.P., LEBACQ-VERHEYDEN A.M. , SCOLARI L. , HEREMANS J.F. *Further Studies on Radial Immunodiffusion - I Direct Proportinnality between Area of Precipitate and Reciprocal of Antibody Concentration .* (Immunochemistry 1969, 6, 279)
- 22) VAHERI A. SEDWICK . W.D., PLOTKIN S.A. - *Growth of Rubella Virus in BHK 21 Cells. Production, Assay, and Adaptation of Virus* (Proc. Soc. Exp. , Biol. Med. 1967 . 125 . 1306.)
- 23) BOUE A. *Serodiagnostic de la rubéole* 1967 . 131 . 266 .

